

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Marburg

DIE MARKIERUNG FUNKTIONELLER ANTIGENE
IM GEWEBE DES
GROSSEN LEBEREGELS (*Fasciola hepatica* L.)
MIT FLUORESC EIN-KONJUGIERTEN ANTIKÖRPERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von —

GERD-EWALD VON MANTEUFFEL
—
aus Sechserben/Gerdauen

Marburg/Lahn 1975
—

Druck: Görlich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)

Aus dem Zoologischen Institut der Universität Marburg

DIE MARKIERUNG FUNKTIONELLER ANTIGENE
IM GEWEBE DES
GROSSEN LEBEREGELS (*Fasciola hepatica* L.)
MIT FLUORESCEIN-KONJUGIERTEN ANTIKÖRPERN

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin

dem Fachbereich Humanmedizin der
Philipps-Universität zu Marburg
vorgelegt von

GERD-EWALD VON MANTEUFFEL

aus Sechserben/Gerdauen

Marburg/Lahn 1975

Druck: Görich & Weiershäuser, Marburg (Lahn)



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der
Universität Marburg/Lahn am 25. März 1975

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs

Dekan: Prof. Dr. med. N. Oepen

Referent: Prof. Dr. phil. E. Geyer

Correferent: Prof. Dr. med. W. Bommer

Die Markierung funktioneller Antigene im
Gewebe des großen Leberegels (*Fasciola
hepatica* L.) mit fluoreszein - konjugierten
Antikörpern.

Gerd-Ewald von Manteuffel

I. Einleitung

II. Material und Methoden

III. Ergebnisse

- A) Fluoreszenztechnik und Kontrollkriterien
- B) Pauschal-Identifizierung funktioneller Fasciola-Antigene in situ bei Juvenil- und Adultegeln
- C) Selektive Identifizierung der funktionellen Fasciola-Antigene f1 bzw. f5 in situ bei Juvenil- und Adultegeln
- D) Kontrolle des Antigenausscheidungsmodus bei Juvenilegeln
 - a) Pauschal-Kontrolle
 - b) Selektive Kontrolle

IV. Diskussion

V. Zusammenfassung

VI. Literatur

I. Einleitung

Im Verlauf von Helminthen-Infektionen reagieren Säugetiere auf den Antigenreiz des Parasiten mit der Bildung von Antikörpern. Wie bei den Infektionskrankheiten mikrobieller Genese wird die Synthese spezifischer Proteine des Globulin-Typs ausgelöst, die den Immunglobulinen Ig A, Ig E, Ig G und Ig M angehören können. Befriedigende Kenntnisse über die chemische Natur der die Immunkörpersynthese auslösenden Antigene liegen bislang kaum vor.

Der Mangel an definierten, chemisch absolut reinen Antigen-Präparaten ließ bisher keine gezielten Maßnahmen zur selektiven Identifizierung der spezifischen Syntheseorte für Helminthenantigene zu. Dies hängt damit zusammen, daß der spezifische selektive Antigennachweis in situ am sinnvollsten und eindeutig nur durch Markierung mit monospezifischen fluoreszenz-, ferritin- oder radioaktiv gekoppelten Antikörpern entsprechender Homologie geführt werden kann. Diese Indikatoren sind ihrerseits jedoch nur durch Sensibilisierungsmaßnahmen mit dem homologen Antigen verfügbar. Die spezifische Darstellung von Antigenen mit fluoreszierenden Antikörpern ist seit der Entwicklung dieser Methode durch COONS und KAPLAN (1950) durchführbar.

Auf dem Gebiet der Reindarstellung und Charakterisierung von Helminthenantigenen als Grundlage für derartige Untersuchungen sind in letzter Zeit insbesondere am Modell der Fasciolose (*Fasciola hepatica*) Befunde vorgelegt worden (KORACH u.a., 1961; KORACH, 1966; KORACH u. BENEX, 1966 a, 1966 b; TAILLIEZ u.a.,

1967; TAILLIEZ, 1967, 1970; GEYER, 1967, 1968, 1969; GEYER u. ASCHHOFF, 1970).

Die von GEYER bzw. GEYER u. ASCHHOFF beschriebenen Verfahren der Darstellung von zwei genusspezifischen im präzipitierenden System hochreaktiven Fasciola-Antigenen boten die Voraussetzungen, den spezifischen selektiven Nachweis antigenkompetenter Bereiche in diesem Trematoden zu führen und gleichzeitig Aussagen über den Modus der Antigenauscheidung zu treffen. Inwieweit dieses Modell-experiment allgemeingültige Prinzipien für parasitische Trematoden erschließt, ist naturgemäß abhängig von Vergleichsmöglichkeiten mit Resultaten anderer Untersuchungen, die auf gleicher Basis durchgeführt wurden.

Bislang bieten sich dazu nur die kürzlich von TAILLIEZ (1970) mitgeteilten Befunde an, die kurz nach Abschluß der in der Folge dargelegten eigenen Ergebnisse veröffentlicht wurden. Es handelt sich dabei um den Selektiv-Nachweis von funktionellen Fasciola-Antigenen in situ mit Hilfe fluoreszeinin- und J¹³¹-markierter monospezifischer Antikörper. Die dargelegten Ergebnisse werden an geeigneter Stelle mit den eigenen Resultaten verglichen und diskutiert.

Weitere Anhaltspunkte für vergleichende Betrachtungen finden sich bei THORPE (1965). Hier handelt es sich jedoch um Pauschalkontrollen der Lokalisierung funktioneller Fasciola-Antigene in situ bei juvenilen und adulten Leberegel-Exemplaren. Als Indikator wurde die fluoreszeininmarkierte Globulinfraktion von Rattenserum nach experimenteller Infektion verwendet.

Ebenfalls auf der Basis des Antigenpauschalnachweises beruhen Ergebnisse von SUN u. GIBSON (1969) bei Adultexemplaren von *Clonorchis sinensis* sowie von ANDRADE u.a. (1961) und LICHTENBERG (1964) bei Cercarien bzw. adulten Egeln von *Schistosoma*.

In der vorliegenden Arbeit wird über den Pauschalnachweis der Gesamtheit der funktionellen Antigene von *Fasciola hepatica* in situ berichtet. Die Kontrollen wurden sowohl bei Juvenil- als auch bei Adultegeeln anhand von Gefrierflächen- und querschnitten durchgeführt. Als Indikator diente die Gammaglobulinfraktion experimentell infizierter Kaninchen nach Markierung mit Fluoreszeinisothiocyanat (FITC). Geprüft wurde ferner die Lokalisation von zwei *Fasciola*-genusspezifischen funktionellen Antigenen bei Juvenil- und Adultexemplaren dieses Trematoden. Die Markierung erfolgte mit FITC - gekoppelten homologen monospezifischen Antikörpern. Ergänzend werden Aussagen über den Ausscheidungsmodus der Antigene bei lebenden Juvenilegeln getroffen.

II. M a t e r i a l u n d M e t h o d e n

A. Antigene

a) Fasciola-Totalhomogenatextrakt (Adult-Egel):

Adulte lebende Egel aus Schafslebern wurden mehrmals in 0,15 m NaCl (4°C) gewaschen und in folgender Weise aufgearbeitet: Homogenisierung mit Ultra-Turrax (Janke & Kunkel, Staufen) 4 x 30 sec. bei 20000 U/min in N₂-Atmosphäre (4-6°C). Anschließend Ultraschall-Behandlung (Ultrasonic-Disintegrator, MSE, London) 10 min. bei 18000 Hz in N₂-Atmosphäre (4-6°C). Die Homogenate wurden lyophil getrocknet (sog. Lyophilisat), in 0,15 m NaCl 5 h bei 4°C extrahiert und der nach Zentrifugation (5 min, 12000 G) anfallende braune Überstand für die Untersuchung verwendet.

b) Fasciola-Totalhomogenatextrakt (Juvenil-Egel):

Homogenisierung juveniler Egel (20. Tag p.i./NMRI-Mäuse) im Glasgewebsmörser (4°C) nach mehrmaligem Waschen in steriler 0,15 m NaCl. Nach Lyophil-trocknung der Homogenate Extraktion (0,15 m NaCl, steril, 5 h, 4°C) und Zentrifugation (5 min, 12000 G). Der Überstand wurde für die Untersuchung verwendet.

c) Fasciola-Antigen f1:

Das Präparat wurde aus Totalhomogenatextrakt adulter Egel (A. a.) mittels Gelfiltration an Sephadex^R G 75 (E. a.) und anschließender PAA-Disc-Elektrophorese im präparativen Maßstab (E. b.) isoliert. (Abb. 2, 3, 4).

B. Antisera

a) Fasciola-Antigen/f1-Antiserum:

1 Kaninchen (Alaska ♂, Alter 6 Monate, Fütterung:

Erka-Mischfutter Z 6000, Fa. Koch, Hamm; Wasser: ad libitum) erhielt am 1., 2., 3., 5., 9., 19., 45., 73., 207., 217. Tag je eine Injektion von jeweils 4-6 ml f1-Antigen-Lösung in Verbindung mit 0,5 ml Adjuvans, Freund, komplett, i.m. alternierend in den linken bzw. rechten Hinter-schenkel. Blutentnahme am 55. Tag nach der ersten und am 10., 30. und 35. Tag nach der letzten Injektion. Aufbewahrung der Seren bei -35°C (Probenmengen: 0,3 ml Serum)

b) Fasciola-Antigen-f1/ f5-Antiserum:

Als Ausgangsmaterial diente Serum experimentell-infizierter Kaninchen. Von den 5 - 7 gegen Fasciola-Totalhomogenatextraktantigen präzipitierenden Antikörpern (Abb. 5) dieses Serums wurden die Präzipitine bis auf die Komponenten Anti-f1 und Anti-f5 mit entsprechendem Antigen im Überschuß bei $20^{\circ}\text{C}/48\text{h}$ neutralisiert (Abb. 6). Das Neutralisationsantigen wurde mit der PAA-Disc-Elektrophorese (D. b.) aus Totalhomogenatextrakt adulter Egel hergestellt (A.a.). Die Position der f1 - und f5 - Bande im PAA-Disc-Elektropherogramm (Abb. 7) gestatten nach Elektrophorese des Total-extrakts die Abtrennung des Antigens f1 und f5 von den übrigen Extraktkomponenten. Dabei wurde der kathodisch von der Bande f5 gelegene Gelsäulenabschnitt einschließlich Sammelgel abgeschnitten, in 5 mm dicke Scheiben zerkleinert und homogenisiert. Die Proteine ließen sich in A.dest. aus dem PAA-Träger eluieren ($48\text{ h}/4^{\circ}\text{C}$). Nach Gefriertrocknung wurde dieses Material als Neutralisations-Antigen verwendet.

c) Fasciola-Antiserum (experimentelle Infektion):
Zur Verfügung standen Kaninchen-Antiseren (Alaska♂♂, Kleine Chinchilla♂♂, 1500 - 1600 g. Fütterung: wie unter B. a.). Orale Infektion mit Metacercarien. Blutentnahme eine Woche a.i. bis zu 8 Wochen p.i. in wöchentlichem Abstand. Aufbewahrung der Seren bei -35°C (Probenmengen: 1 ml Serum).

d) Normalserum: Seren parasitenfreier Kaninchen (Alaska♂♂ und Kleine Chinchilla♂♂).

C. Infektionsmaterial

Fasciola-Metacercarien wurden uns freundlicherweise vom Veterinary Laboratory Weybridge, Surr., England, überlassen.

D. Elektrophoresen und Doppel-Diffusionstest

a) Papierelektrophorese

Es wurde die Methode von Grassmann und Hanning (1952) mit der LKB-Standard-Apparatur durchgeführt. Papier: Schleicher & Schüll 2043 bmg1 (4 x 41 cm). Na-Acetat/Na-DABS-Puffer (0,05 Na-Acetat, 0,05 m Na-Diäthylbarbitursäure), pH 8,6. Spannung: 5 V/cm. Laufzeit: 16 h. Proteinfärbung: 0,5 % Amido-Schwarz 10 B.

b) Polyacrylamid-Disc-Elektrophorese

Durchgeführt wurde mit geringfügigen Abänderungen die von DAVIS (1964) beschriebene Methode mit Gelsäulen von 4,5 x 0,5 cm. Gelbereitung: a) Trenngel (3,5 cm): 6%ige Acrylamidlösung (EASTMAN) in Tris/HCl-Puffer (3 m Tris), pH 8,9 Katalysation mit Ammonpersulfat (Chemopolymerisation). b) Sammelgel (1,0 cm): 2%ige Acrylamidlösung in Tris-HCl/Puffer (0,5 m Tris), pH 6,7, Riboflavin-Katalysation

(Photopolymerisation), Elektrodenpuffer: Tris/Glykokoll (0,05 m Tris, 0,4 m Glykokoll), pH 9,2. Zusatz von 1%iger Bromphenolblaulösung zur Markierung der Pufferfront. Stromstärke: 4 mA/Säule. Laufzeit: 35 - 40 min.. Proteinfärbung: 1% Amidoschwarz 10 B.

c) Immunoelektrophorese

Agarosegel-Immunoelektrophorese: Bei der Immuno-elektrophorese nach GRADAR und WILLIAMS (1953) wurde die Mikromethode nach SCHLEDEGGER (1955) mit der LKB-Standard-Apparatur angewendet. Agarosegel: 1%ige Agarose (Serva) in Na-Acetat/Na-DABS-Puffer (0,05 Na-Acetat, 0,05 m Na-Diäthylbarbitursäure), pH 8,6. Dieser Puffer diente auch als Elektroden-Puffer. Zusatz von 50 mg NaN_3 /100 ml Agarose. Becken $\varnothing$: 3 mm, Rinne: 2 x 60 mm. Spannung: 3 V/cm. Laufzeit: 3h. Proteinfärbung: 0,05% Amidoschwarz 10 B.

d) Doppel-Diffusionstest

Das Verfahren wurde mit der LKB-Standard-Apparatur durchgeführt. Agarosegel: 1% Agarose (Serva) in Na/Acetat/Na-DABS-Puffer (0,05 m Na-Acetat, 0,05 m Na-Diäthylbarbitursäure), pH 8,6. Zusatz von 50 mg NaN_3 /100 ml Agarose. Becken $\varnothing$: 3 mm, Abstand der Beckenmittelpunkte: 8 mm. Proteinfärbung: 0,05% Amidoschwarz 10 B.

E. Fraktionierungsverfahren

a) Gelfiltration:

Sephadex^R G 75 im Säulenexperiment. Säulenfüllung: 900 x 15 mm. Eluant: 0,05 m Tris/HCl-Puffer (Cialit^R 1:10000, Asid, München), pH 7,0; $T = 4^\circ\text{C} \pm 0,3$; Durchfluss: 6,0 ml/h; photometrische Eluatkontrolle:

LKB-Uvicord I bei 254 nm. Probenvolumen: 2,5 ml (= 10% Gew./Vol.) Totalhomogenatextrakt adulter Egel.

b) PAA-Disc-Elektrophorese (präparativer Maßstab): Gerät: "Poly-Prep" der Firma Buchler Instruments, Inc. Fort Lee, New Jersey, USA. Gelbereitung: a) Trenngel (3,0 cm): 6%ige Acrylamid-Lösung (Eastman) in Tris/HCl-Puffer (1,5 m Tris), pH 8,9, Katalysation mit Ammonpersulfat. b) Sammelgel (0,5 cm): 2%ige Acrylamidlösung in Tris/H₃PO₄-Puffer (0,5 m), pH 7,2, Riboflavin-Katalysation. Kathodenpuffer: Tris/Glykokoll (0,05 m Tris, 0,05 m Glykokoll), pH 8,9; Anoden- und Elutionspuffer: Tris/HCl (0,1 m Tris), pH 8,1. Stromstärke: 40 mA; Säulen und Eluantkühlung: 4°C ± 0,3; Durchfluß: 0,5 ml/min; photometrische Eluatkontrolle: LKB-Uvicord I bei 254 nm. Probenmengen: 20 mg Gesamtprotein.

Protein-Entsalzung: Gelfiltration an Sephadex^R G 25 (fine). Säulenfüllung: 300 x 13 mm. T = 4°C ± 0,3; Durchfluß: 6,0/h; photometrische Eluantkontrolle: LKB-Uvicord I bei 254 nm.

F. Experimentelle Fasciola Infektion

Die Bestimmung der Infektionsdosis erfolgte durch Auszählung der auf Cellophan encystierten 14 Tage bis 3 Monate alten Metacercarien. Vitalitätstest durch mikroskopische Kontrolle der Metacercariencysten (jeweils 10% der verwendeten Chargen) nach mechanischer Ablösung der äußeren Cystenmembran. Die Infektionsitätsprüfung wurde nach Parallel-Infektion von Mäusen (Albano♂♂) anhand von Leberkontrollen zwischen dem 22. und 24. Tag p.i. vorgenommen.

Infektionsmodus: Gelatine-Kapseln ad usum vet./
Kaninchen; Oralapplikation auf Weißbrot/Maus.

G. Gammaglobulin-Präparation, FITC-Kopplung

Zu 20 ml Serum wurde der gleiche Anteil 3,2 m Ammonsulfatlösung in 0,15 m NaCl tropfenweise hinzugegeben. Die erst bei den letzten Tropfen $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gebildete Ausfällung wurde 30 min. bei 10000 UpM in der Kühlzentrifuge (4°C) abgeschleudert, einmal mit 2 m $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ gewaschen und erneut bei 10000 UpM/ 4°C zentrifugiert. Das Präzipitat wurde in 8 ml 0,15 m NaCl aufgenommen. Die Abtrennung des $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ erfolgte an Sephadex^R G 25 (0,1 m Tris/HCl, pH 8,0). Gelfiltration: Sephadex G 25 (Pharmacia Uppsala). Säule 300 x 13 mm. Puffer: Tris/HCl, pH 8,0.

Stufenweise Elution an DEAE-Sephadex^R A 50-Ionenaustauscher mit 0,1; 0,2; 0,3; und 0,35 m Tris/HCl-Puffer, (pH 8,0).

Einengung des 0,3 m Tris/HCl-Eluats (reines Gammaglobulin) durch Ultrafiltration, anschließend Gefriertrocknung. Kopplung mit FITC (10 mg FITC/1 g Protein in 0,5 $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ -Puffer (pH 9,3) 20 h/ 4°C . Verwendet wurde Fluoresceinisothiocyanat der Firma Sylvana Company, Millburn, N.J., USA. Abtrennung des überschüssigen FITC an Sephadex^R G 25 (0,1 m Tris/HCl-Puffer, pH 8,0). Elution des optimal gekoppelten FITC-konjugierten Gammaglobulins an DEAE-Sephadex A 50-Ionenaustauscher mit 0,3 m Tris/HCl, pH 8,0.

Einengung durch Ultrafiltration und Aufbewahrung des Konjugats (1 ml Proben) bei -40°C . Einengung

des FITC-gekoppelten Materials durch Ultrafiltration: Benutzt wurden Kollodiumhülsen und Haltevorrichtungen für Kollodiumhülsen der Firma Sartorius-Membranfilter GmbH, Göttingen. Kollodiumhülsen: Typ SM 12300, Haltevorrichtungen für Kollodiumhülsen: Typ SM 16305.

Schematische Zusammenstellung: siehe Abb. 1 a

GAMMAGLOBULIN-PRÄPARATION UND KOPPLUNGSSCHEMA

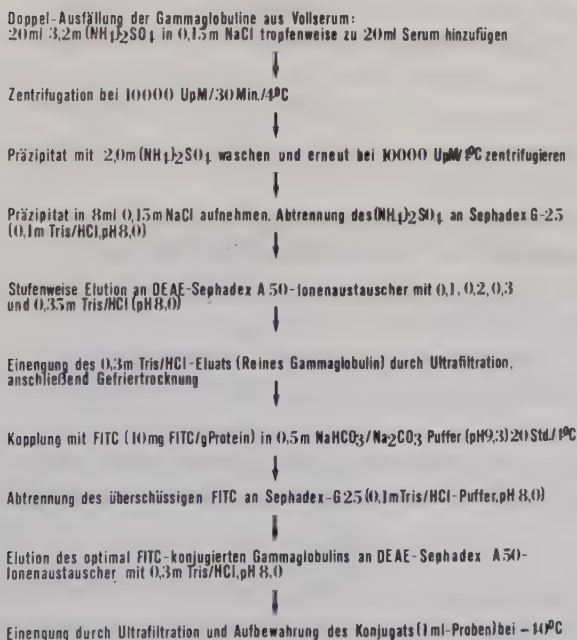


Abb. 1 a. Schema der Gammaglobulin-Präparation und FITC-Kopplungsverfahren

H. Gefrierschnitte:

a) Hergestellt wurden Quer- und Flächenschnitte adulter Egel (Rind) und juveniler Parasiten (20 - 24 Tage p.i. Maus). Schnittdicke: 10μ . Gerät: Kryostat System Dittes-Duspiva, Walter Dittes, Heidelberg a.N.; Temperatur: -13°C .

Die Gefrierschnitte wurden auf Objektträger aufgezogen und zum Trocknen in einen mit CaCl_2 gefüllten Glasbehälter gestellt.

b) Antigen-Markierung: Die getrockneten Gefrierschnitte wurden mit einigen Tropfen der FITC-gekoppelten Globulinlösung überschichtet, Inkubationsdauer: 1 h/ 37°C . Anschließend wurde mehrmals mit 0,3 M Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) gespült. Die Einbettung der behandelten Schnitte erfolgte in Waschpuffer/Glycerin (1:9).

c) Mikroskopische Fluoreszenzkontrolle: Mikroskop: Mikroskop Ortholux mit Fluoreszenzeinrichtung und automatischer Mikroskop-Kamera ORTHOMAT, Ernst Leitz GmbH, Wetzlar. Erregerfilter: UG1, UG5 und BG38. Sperrfilter: UV-Filter. UV-Quelle: Lampenhaus 250 mit Quecksilberhöchstdruckbrenner HBO 200 W oder CS 150 W.

Photographische Dokumentation: Schwarzweiß Aufnahmen: Adox KB 14; Farbaufnahmen: Agfa-Color CT 18, Kunstlicht.

ARBEITSGANG

Totalhomogenat adulter Egel (0,15m NaCl, pH6,0)



Gelfiltration an Sephadex G-75 (0,05m Tris/HCl, pH7,0)



Subfraktion 3, Stabilisierung und Konzentrierung
mit $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ bei 4°C



Entsalzen: Dialyse 48h/4°C



PAA-Disc-Elektrophorese im präparativen Maßstab



Konzentration der Antigen-Fraktion f1



Reinheits-Prüfung mittels analyt. PAA-Disc-Elektrophorese



Gewinnung monospezifischer Antiseren durch Booster-
Injektion (Kaninchen)



Kopplung der Gamma Globuline (siehe Kopplungsschema)



Prüfung: Papierelektrophorese, Immunelektrophorese,
Ouchterlony



Gefrierschnitte



Direkte Immunofluoreszenz-Methode

Abb. 1 b. Verfahrenstechnik bei der Darstellung des funktionellen Fasciola-Antigens f1, des homologen Antiserums bis zur Anwendung in der direkten Fluoreszenz-Methode zum spezifischen, selektiven Nachweis der Antigenlokalisierung im Leberegel.

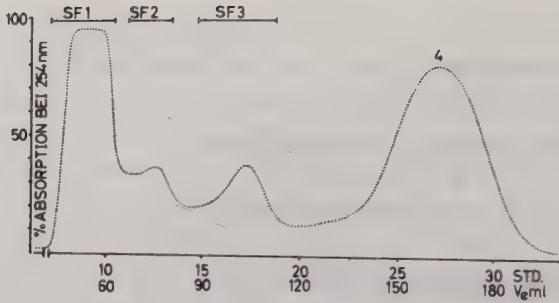


Abb. 2. Elutionsdiagramm von Fasciola-Totalhomogenatsextrakt: Sephadex[®] G 75, Gelbett: 900 x 15 mm; SF1, SF2, SF3 = Subfraktionen; 4 Proteinfreies Eluat.

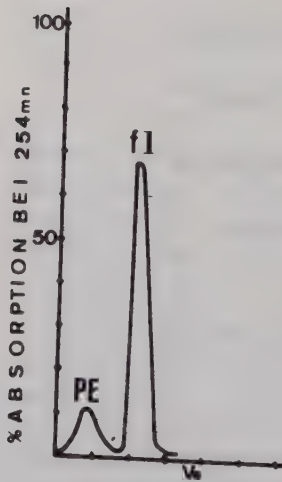


Abb. 3. Elutionsdiagramm des Fasciola-Antigens f1 bei präparativer PAA - Disc - Elektrophorese der Totalhomogenat-Subfraktion 3 (SF3, Abb. 2). PE = Proteinfreies Eluat; f1 = Fasciola-Antigen f1.

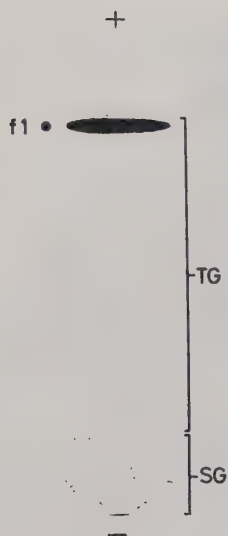


Abb. 4. PAA-Disc-Elektropherogramm des durch Kombination von Gelfiltration (Sephadex^R G 75) und präparativer PAA-Disc-Elektrophorese dargestellten *Fasciola hepatica* - Antigens f1. Amido-Schwarz. TG Trenngel, SG Sammelgel.

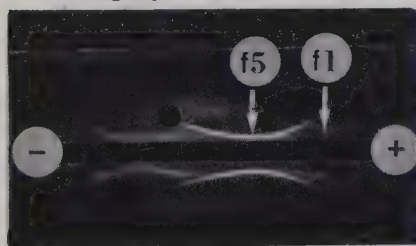


Abb. 5. Immunelektropherogramm von Serum experimentell infizierter Kaninchen im Ansatz gegen Totalhomogenat-extrakt junger Leberegel (Maus; 20. - 24. Tag p.i.). f1 bzw. f5 = Präzipitat des funktionellen *Fasciola*-Antigens f1 bzw. f5 mit den homologen Antikörpern.



Abb. 6. Immunelektrophoretische Kontrolle des selektiv neutralisierten FITC - markierten Antiserums (NA) zum Nachweis der alleinigen Anwesenheit von Anti f1 und Anti f5. Reaktion im Ansatz gegen Totalhomogenatextrakt juveniler Leberegel (TI). f1 bzw. f5 Immunpräzipitat f1/Anti f1 bzw. f5/Anti f5.

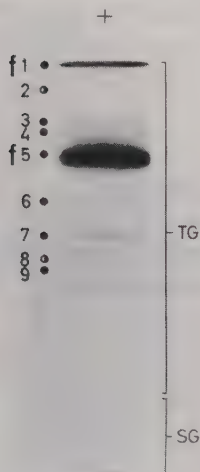


Abb. 7. PAA-Disc-Elektropherogramm von Totalhomogenat - Subfraktion 3 (Abb. 2). Amido-Schwarz 10 B. TG Trenngel, SG Sammelgel. f1 bzw. f5 = Position der funktionellen Fasciola - Antigene f1 bzw. f 5.

III. E r g e b n i s s e

A) Fluoreszenztechnik und Kontrollkriterien

Nach Entwicklung der Methode (COOMS u. KAPLAN, 1950), mit Hilfe fluoreszierender Antikörper spezifische Antigene darstellen zu können, bestand anfänglich u.a. das Problem der unterschiedlichen Farbstoffqualität. Es ist nunmehr zum Teil durch die Einführung stabiler Fluoreszenzfarbstoffe in kristalliner reiner Form erheblich verringert worden. Trotzdem ist das Verfahren auch heute noch mit Unsicherheitsfaktoren belastet. Diese konzentrieren sich um das Phänomen der unspezifischen Mitfärbung, sei es beim Antigennachweis in Gewebekulturen oder in histologischen Präparaten. Die Überfärbung kann im wesentlichen durch folgende Faktoren verursacht werden:

- 1) Durch freie, nicht an die Antikörperproteinmoleküle gebundene Farbstoffmoleküle.
- 2) Durch ein Mißverhältnis zwischen der Menge des Antikörperkonjugats zu den anderen ebenfalls mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Serumproteinen der Gammaglobulinfraktion.
- 3) Durch Verschiebung des isoelektrischen Punktes des Gammaglobulins nach Kopplung mit Fluoreszein-isothiocyanat durch die negativen Gruppen des FITC. Dadurch wird eine unspezifische Bindung an basische Gewebsproteine ermöglicht.

4) Durch Verwendung älterer FITC-Antikörper-Konjugate. Von der Autofluoreszenz einiger Gewebe, welche meist rötliche oder bläuliche Tönungen zeigt, ist die gelbgrüne Färbung des FITC im allgemeinen leicht zu unterscheiden.

Aus den genannten Gründen wurden deshalb zur Vermeidung unspezifischer Fluoreszenzmarkierungen bei der FITC-Kopplung an die verwendeten Gammaglobulinfraktionen folgende Punkte beachtet:

1) Durch zusätzliche Chromatographie an DEAE-Ionenaustauscher der nach doppelter Ammonsulfatfällung aus Vollseren gewonnenen Gammaglobuline wurde eine größere Reinheit und Verbesserung der Spezifität erzielt (Abb. 8). Diese Maßnahme führte zu homogenen 7 s - Gammaglobulinen, welche eine gleichmäßige Kopplung begünstigen (VOSS u.a. 1967).

2) Beachtet wurde ein exaktes Verhältnis von Proteinstandard zur FITC-Menge. Dabei lag die Protein-Farbstoff-Relation bei 1 g Gammaglobulin/10 mg FITC. Bei dieser geringen FITC-Einsatzmenge ist eine gleichmäßige Kopplung am günstigsten zu erzielen (VOSS u.a. 1967).

3) Die Zuführung des FITC-Pulvers erfolgte durch eine Dialysier-Membran. Diese Maßnahme begünstigt ebenfalls eine sehr gleichmäßige Kopplung.

4) Das Gammaglobulin/FITC-Konjugat wurde nach Abtrennung des ungebundenen Farbstoffes einer weiteren Konjugatfraktionierung an DEAE - Sephadex^R A 50 unterworfen. Durch stufenweise Elution mit Tris/HCl-Puffer (pH 8,0) verschiedener Molarität ließen sich die Konjugate mit der günstigsten FITC/Gammaglobulin-Relation gewinnen (Abb. 9). Dieses

Material führt zu brillanten spezifischen Färbungen. Konjugate mit zu niedrigem bzw. zu hohem FITC/Protein-Verhältnis konnten auf diese Weise eliminiert werden (VOSS u.a. 1967).

5) Die Konjugate wurden in kleinen Proben bei -38°C gelagert.

Kriterien für die Fluoreszenzspezifität:

Bei den in der Folge dargelegten Ergebnissen galt eine Fluoreszenz im Fasciola-Gewebe nach Behandlung mit FITC-markierten Antikörpern nur dann als spezifisch (Abb. 10 a), wenn in Parallelschnitten

a) nach Behandlung mit nicht markierten Antikörpern und anschließender Behandlung mit FITC-gekoppelten Antikörpern keine Fluoreszenz zu beobachten war (Abb. 10 b).

b) nach Behandlung mit FITC-gekoppeltem Gamma-globulin aus Normalseren (antikörperfrei!) keine Fluoreszenz auftrat (Abb. 10 c).

c) nach in vitro-Neutralisation der mit FITC-gekoppelten Antikörper durch homologe Antigene keine Fluoreszenz zu beobachten war. (Abb. 10 d).

Der Zeitpunkt des Synthesebeginns humoraler Antikörper durch den empfänglichen Wirtsorganismus ist abhängig von der Infektionsstärke. Bei starkem Befall gelingt der Nachweis präzipitierender Antikörper im Verlauf der Infektion oft bereits 14 Tage post infectionem. Bei schwächerer Infektionsbelastung hingegen treten die Präzipitine erst später im

peripheren Blut auf. Immer liegt der Zeitpunkt des Antikörpersynthesebeginns jedoch in der Phase der Lebergewebswanderung der Juvenilegeln. Ihr Muster funktioneller Antigene muß deshalb als Auslösefaktor für die Antikörpersynthese angesehen werden.

Nach der Einwanderung der Egel in die Gallengänge der Leber und während der gesamten Gallengang-Lebensphase von *Fasciola hepatica* bleibt das Muster präzipitierender Antikörper im Prinzip nahezu unverändert (Abb. 11). Bei dieser Feststellung, die für das Modell der Fasciolose des Kaninchens gilt und wahrscheinlich auch für eine Reihe anderer adäquater Wirte des Großen Leberegels sind jedoch keine Aussagen über denkbare Titterschwankungen bzw. über einen Titerabfall in der chronischen Phase berücksichtigt. Trotzdem berechtigt dieses Phänomen zu der Aussage, daß auch die Adultegel während der Gallengang-Lebensphase funktionelle Antigene ausscheiden mit der Folge eines permanenten Synthesereizes auf das immunkompetente System des Wirtes.

Auf Grund dieser Befunde wurde der Pauschal- und Selektivnachweis funktioneller Antigene in situ sowohl bei Juvenil- als auch bei Adultegeln mit FITC-markierten Antikörpern vorgenommen.

B) Pauschal-Identifizierung funktioneller Antigene in situ.

a) Antigen-Markierung bei Juvenilegeln (22. - 24. Tag p.i./ Maus)

- 1) Bei der Kontrolle unbehandelter Gefrierschnitte (Quer- und Flächenschnitte, 10 μ) wurde eine

unspezifische Fluoreszenz nicht bemerkt.

2) Nach Inkubation mit FITC-markierten 7s-Gammaglobulinen experimentell infizierter Fasciolose-Kaninchen zeigte sich spezifische Fluoreszenz im Darmlumen bzw. in den Darmepithelzellen (Abb. 12, 13, 14). Fluoreszenz trat auch im Tegument und den subtegumentalen Gewebsschichten auf (Abb. 15). Verglichen mit der Fluoreszenz des Darmes war diese weniger ausgeprägt.

3) Kontrollmarkierungsversuche mit FITC-7s-Gammaglobulinen normaler, parasitenfreier Kaninchen führten weder im Darmlumen und Darmepithel noch im Tegument und Subtegumentbereich zur Fluoreszenzreaktion (Abb. 16).

Dieses Ergebnis deutet auf eine Lokalisierung der funktionellen Antigene in den unter 2) aufgeführten Bereichen hin.

Zur weiteren Kontrolle der Spezifität der beobachteten Fluoreszenz wurden die nachfolgenden Blockierungs- bzw. Neutralisationsexperimente durchgeführt:

a) Die Gefrierschnitte wurden zur Blockierung der Antigene mit nicht FITC-markierten Gammaglobulinen experimentell infizierter Kaninchen inkubiert. Die Reaktionszeit betrug 6 h/37°C. Zur Sicherung einer vollständigen Antigenblockierung durch die homologen Antikörper wurde diese Maßnahme wiederholt. Anschließende Markierungsversuche mit nunmehr FITC-markierten Gammaglobulinen experimentell infizierter Fasciolose-Kaninchen verliefen negativ. Weder im Darm noch im Tegument- und Subtegumentbereich trat eine Fluoreszenz auf (Abb. 17).

b) Zur Neutralisation der FITC-gekoppelten Antikörper experimentell infizierter Kaninchen wurde vor der Inkubation homologes Antigengemisch in Form von Totalextrakt juveniler Egel im Überschuß zugeführt. Die Reaktionszeit betrug 12 h/37°C. Das nach dieser Zeit entstandene Reaktionsprodukt der Antigen-Antikörper-Präzipitate wurde abzentrifugiert und der FITC-gekoppelte Überstand der Gammaglobulinlösung zur Inkubation der Gefrierschnitte verwendet. Durch dieses Neutralisationsverfahren waren die FITC-Antikörper eliminiert. Dementsprechend trat auch hier weder im Darm noch im Tegument- und Subtegumentbereich Fluoreszenz auf.

Diese Kontrollexperimente sind beweisend für die spezifische Antigenmarkierung im Darm-, Darmepithel, Tegument und Subtegumentbereich von Juvenilegeln.

b) Antigen-Markierung bei Adultegeln

1) Bei der Kontrolle unbehandelter Gefrierschnitte (Quer- und Flächenschnitte, 10 μ) wurde eine unspezifische Autofluoreszenz der Dotterstöcke sowie bei Uterusanschnitten in den Kapseln der Fasciola-Eier registriert (Abb. 18, 19).

2) Nach Inkubation mit FITC-markierten 7s-Gammaglobulinen experimentell infizierter Fasciolose-Kaninchen zeigte sich eine spezifische von der rötlichen Autofluoreszenz gut unterscheidbare grünliche Fluoreszenz im Darmlumen bzw. in den Darmepithelzellen (Abb. 19). Spezifisch markierte

Antigene wurden auch im Tegument- und Subtegumentbereich bemerkt (Abb. 20).

3) Kontrollmarkierungsversuche mit FITC-7s-Gammaglobulinen normaler, parasitenfreier Kaninchen führten zu keiner spezifischen Fluoreszenzreaktion. Bei der Spezifitätsprüfung nach Blockierung der Antigene mit ungekoppelten Gammaglobulinen experimentell infizierter Fasciolose-Kaninchen sowie nach Neutralisation der FITC-markierten Antikörper in vitro durch homologes Juvenilegel-Totalextrakt-Antigen zeigte sich der spezifische Charakter der Darm- bzw. Tegumentfluoreszenz nach Behandlung mit FITC-Antikörpern. Bei beiden Kontrollexperimenten konnte keine FITC-Markierung erreicht werden (Abb. 21).

Dieser Befund ist identisch mit den bei Juvenilegeln erzielten Ergebnissen. Somit sind auch bei Adultexemplaren von *Fasciola hepatica* die funktionellen Antigene im Darm-, Darmepithel-, Tegument- und Subtegumentbereich lokalisiert.

C. Selektive Identifizierung funktioneller Antigene in situ.

Überprüft wurden in Gefrierschnitten (Quer- und Flächenschnitte, 10 μ) von Juvenilegeln (22. - 24. Tag p.i./ Maus) und adulten *Fasciola*-Exemplaren die Lokalisierungsbereiche der genusspezifischen *Fasciola*-Antigene f1 und f5. Als Indikator diente FITC-gekoppeltes 7s-Gammaglobulin homologer monospezifischer Antiseren bzw. selektiv in vitro neutralisierter Seren experimentell

infizierter Fasciolose-Kaninchen.

a) Antigen-Markierung bei Juvenilegeln

1) Die Markierung mit FITC-gekoppelten Gamma-globulin- bzw. FITC-Fasciolose-Neutralisations-Serum führte zu spezifischer Fluoreszenz im Darmlumen, Darmepithel, Tegument und Subtegumentbereich. Vergleiche mit Ergebnissen bei der pauschalen Antigen-Identifizierung zeigten bei der selektiven Kontrolle eine schwächere Intensität der Fluoreszenz (Abb. 22).

2) Die Markierungsversuche mit FITC-gekoppelten Gammaglobulinen normaler, parasitenfreier Kaninchen verliefen negativ.

3) Die Spezifitätskontrollen nach Antigen-Blockierung bzw. Antikörper-Neutralisation in vitro führten zu keiner Fluoreszenz und brachten somit den Beweis der spezifischen Reaktion mit FITC-gekoppelten Antikörpern.

b) Antigen-Markierung bei Adultegeln

1) Die Ergebnisse der Markierungsversuche mit FITC-gekoppelten Gammaglobulinen bzw. FITC-Fasciolose-Neutralisations-Seren entsprachen den bei Juvenilegeln konstatierten Befunden: Spezifische Fluoreszenz zeigte sich im Darmlumen, Darmepithel, Tegument und Subtegumentbereich. Auch bei diesen Experimenten war die Fluoreszenzintensität weniger stark ausgeprägt als bei den entsprechenden Versuchen zur pauschalen Antigen-Identifizierung (Abb. 23).

2) Die Markierungsversuche mit FITC-gekoppelten Gammaglobulinen normaler, parasitenfreier Kaninchen führten zu keiner Fluoreszenz.

3) Markierungskontrollen nach Antigen-Blockierung bzw. Antikörper-Neutralisation in vitro erbrachten keine Fluoreszenz.

Diese Befunde zeigen, daß sowohl bei Juvenil- als auch bei Adultegeln die beiden genusspezifischen funktionellen Antigene f1 und f5 im Darm und im Tegument sowie im Subtegumentbereich lokalisiert sind. Sie befinden sich demnach in situ zusammen mit den anderen funktionellen Antigenen in diesen streng abgegrenzten Bereichen. Eine denkbare spezifische auf den Darm oder nur auf das Tegument-/ Subtegument beschränkte Lokalisierung kann somit ausgeschlossen werden.

D) Kontrolle des Antigenausscheidungsmodus bei Juvenilegeln:

Da sowohl die Gesamtheit der funktionellen Antigene als auch die genusspezifischen Antigene f1 und f5 im Darm und im Tegument- / Subtegumentbereich lokalisiert sind, war zu erwarten, daß beim intakten lebenden Egel die Antigenausscheidung über die gesamte Körperoberfläche und mit dem Regurgitat, dem erbrochenen Darminhalt, erfolgt. Um dies zu überprüfen, war es notwendig, eine Methode zu verwenden, die den Nachweis einer streng lokalisierten sichtbaren Antigen-Antikörper-Reaktion ermöglicht. Dazu bot sich der Nachweis der ausgezeichnet

kontrollierbaren Präzipitations-Reaktion an.

Die 22 - 24 Tage alten Juvenilegel wurden direkt nach Sektion der Parasitenträger (Albino-Mäuse ♂♂, Stamm Albano) und nach Auswaschen aus dem Lebergewebe, in 0,15 m Kochsalzlösung (37°C) überführt und gewaschen. In diesem einfachen Medium überleben Jungegel von *Fasciola hepatica* über 24 Stunden. Dabei führen sie lebhaft wellenförmige Kontraktionsbewegungen aus, wobei in gewissen Zeitabständen Portionen des Darminhaltes durch die Mundöffnung entleert werden.

Immunoelktrophoretische Kontrollen von Kochsalz-Lyophilisaten nach Inkubation von Juvenilegeln führten im Ansatz gegen Seren experimentell infizierter Kaninchen zum Nachweis von präzipitierenden Antigen-Antikörperkomplexen. Darunter befanden sich auch die beiden Immunpräzipitate, in die die Antigene f1 und f5 als Reaktionspartner eingehen. (Abb. 5). Dieser Befund kann als Pauschalnachweis für die eingangs erwähnte Vermutung gelten, daß Juvenilegel auch außerhalb des spezifischen Befallsorgans funktionelle Antigene ausscheiden.

Zur Kontrolle der genauen Bereiche der Antigenausscheidung wurden lebende Juvenilegel in ein flüssiges Gemisch (50 - 52°C) aus Agarose (pH 8,6 Na-Azetat - DABS - Puffer) und verschiedenen antikörperhaltigen und -freien Seren bzw. Gammaglobulinlösung eingebettet. Nach Erstarren des Mediums wurden die total darin eingeschlossenen Egel für 12 h/37°C in eine feuchte Kammer verbracht. Auf diese Weise konnte an den Stellen der Antigenausscheidung auf

Grund der Antigendiffusion eine Präzipitationsreaktion mit den homologen, in der umgebenden Agarose eingeschlossenen Antikörpern erfolgen.

Diese Versuche wurden durchgeführt zum Pauschal-Nachweis mit a) Seren experimentell infizierter Fasciolose Kaninchen, b) Seren normaler, parasitenfreier Kaninchen, c) FITC-gekoppelten Gammaglobulinen experimentell infizierter Fasciolose-Kaninchen, d) FITC-gekoppelten Gammaglobulinen parasitenfreier Kaninchen, e) zum selektiv-Nachweis mit f1 / f5 - monospezifischen Antiseren und f) FITC-gekoppelten Gammaglobulinen von f1 / f5 monospezifischen Antiseren.

a) Pauschal-Nachweis des Ausscheidungsmodus funktioneller Fasciola-Antigene.

Präzipitationsareale im Agarose / Antikörper-Gemisch (a), c)) zeigten sich entweder an der Mundöffnung der Egel (Abb. 24) oder gleichmäßig um den gesamten Egel herum (Abb. 25). Die angewendete Kontrollmethode, die eine Modifikation der radialen Immundiffusion nach MANCINI darstellt, gestattet bei konstanter Antikörperkonzentration eine zusätzliche Aussage über die Konzentration der ausgeschiedenen Antigene. Es ergab sich, daß die Konzentration der durch die Mundöffnung abgegebenen Antigene niedriger ist, als die der über die Körperoberfläche ausgeschiedenen Antigene. Dieses Phänomen läßt sich an der Fläche der Präzipitationsareale ablesen. Ausgedehnte Präzipitatflächen entsprechen

höheren Antigenkonzentrationen. In antikörperfreier Agarose (b), d)) wurden niemals Präzipitationsreaktionen registriert.

b) Selektiv - Nachweis des Ausscheidungsmodus der funktionellen genusspezifischen Antigene f1 / f5.

Hier wurden die Präzipitationsareale im Agarose-Antikörpergemisch (e)) ebenfalls entweder in der Mundöffnung der Egel oder um den gesamten Egel gefunden. Antikörperfreie Agarose (f)) führte zu keiner Reaktion.

Durch diese Kontrollen bestätigte sich die Vermutung, daß die Gesamtheit der funktionellen Fasciola-Antigene und auch die Einzelantigene f1 / f5 sowohl durch die Mundöffnung im Regurgitat der Egel als auch über die gesamte Körperoberfläche ausgeschieden werden können. Der Befund steht somit im Einklang mit den Ergebnissen der Antigenmarkierung in situ.

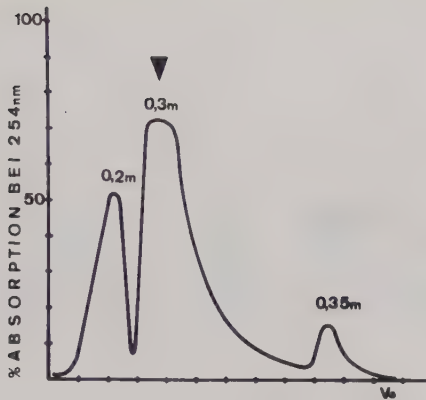


Abb. 8. Elutionsdiagramm von Gammaglobulinen (Kaninchen) nach Ionenaustauscher - Chromatographie an DEAE Sephadex^R A-50 zur Gewinnung reiner 7s-Gammaglobuline. (Elution mit 0,3 m Tris/HCl-Puffer, pH 8,0).

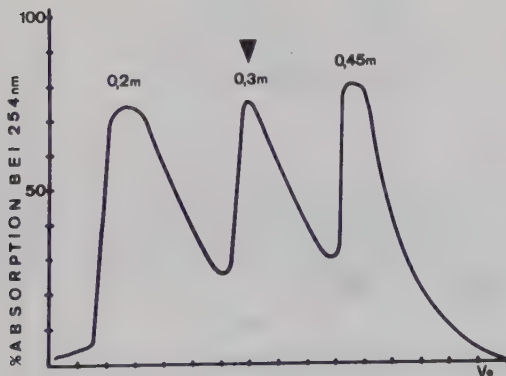


Abb. 9. Elutionsdiagramm von FITC-markierten Gammaglobulinen (Kaninchen) nach Ionenaustauscher - Chromatographie an DEAE Sephadex^R A-50 zur Gewinnung des optimal konjugierten Anteils. Elution mit 0,3 m Tris/HCl-Puffer, pH 8,0.

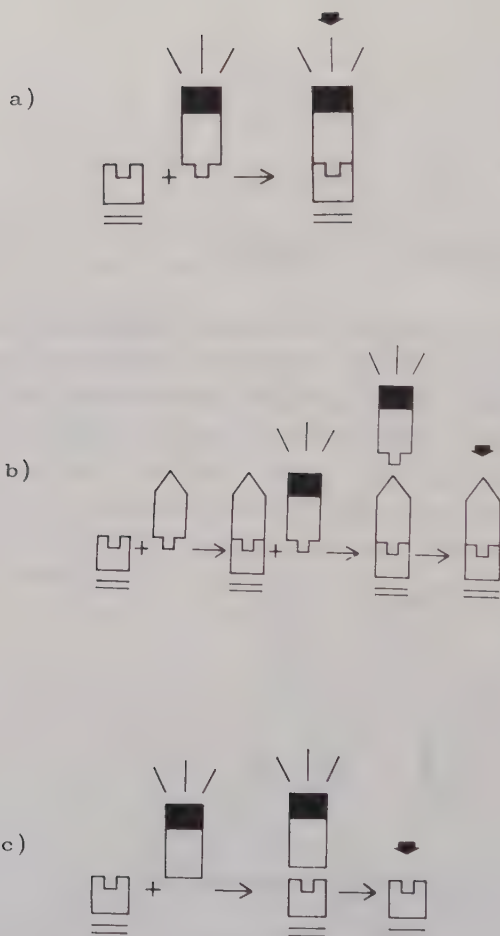
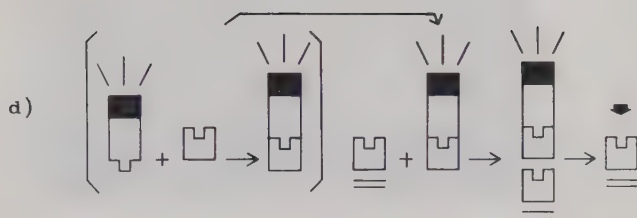


Abb. 10 a - c (Legende siehe Seite 31)



ZEICHENERKLÄRUNG

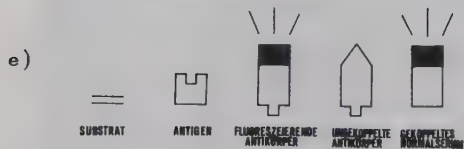


Abb. 10 a - e. Darstellung des Prinzips der direkten Fluoreszenzmethode und der durchgeführten Kontrollversuche. Beschreibung im Text: Seite 19.

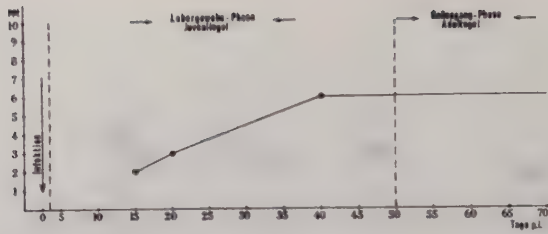


Abb. 11. Beginn der Synthese präzipitierender humoraler Antikörper im Verlauf der Fasciolose des Kaninchens nach Infektion mit 50 Metacercarien. PPT = Anzahl der Immunpräzipitate.

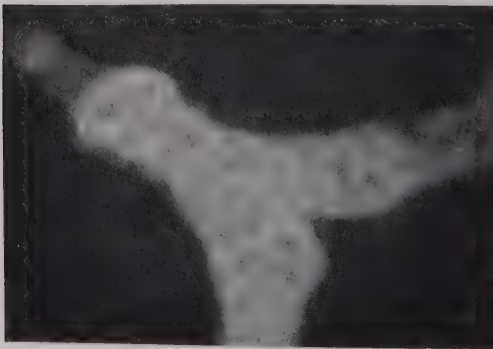


Abb. 12. Juvenileleget: Reaktionsbild des Darmes im Bereich der Darmschenkelgabelung hinter dem Oesophagus nach Imprägnierung mit FITC - markierten Gammaglobulin experimentell infizierter Kaninchen: Intensive spezifische Fluoreszenz. Verg. 100 x.

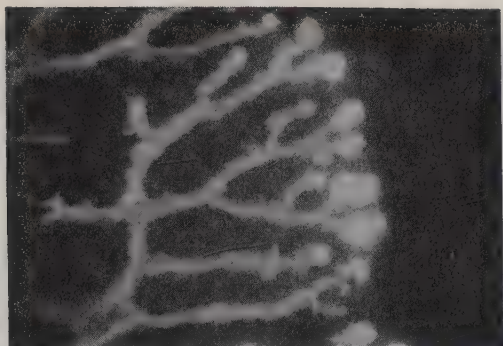


Abb. 13. Juvenilelegel: Reaktionsbild der Darmäste und Divertikel nach Imprägnierung mit FITC - markierten Gammaglobulin experimentell infizierter Kaninchen: Intensive spezifische Fluoreszenz. Vergr. 35 x.

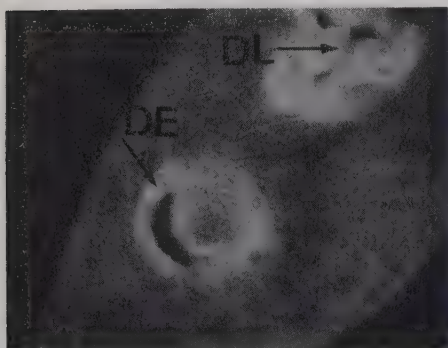


Abb. 14. Juvenilelegel-Querschnitt: Reaktionsbild des Darmepithels (DE) bzw. Darmlumens (DL) nach Behandlung mit FITC - markierten Gammaglobulinen experimentell infizierter Kaninchen: Spezifische Fluoreszenz. Vergr. 100 x.

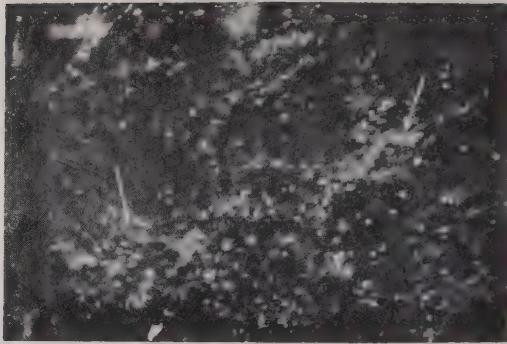


Abb. 15. Juvenilegel-Flächenschnitt im Tegumentbereich: Reaktionsbild nach Behandlung mit FITC - markierten Gammaglobulinen experimentell infizierte Kaninchen: Spezifische Fluoreszenz. Vergr. 100 x.

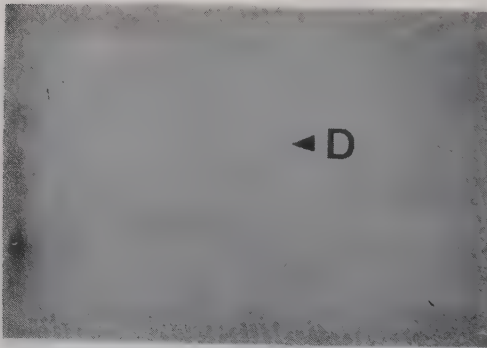


Abb. 16. Juvenilegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmes (D) nach Behandlung mit FITC - markierten Gammaglobulinen normaler, parasitenfreier Kaninchen: Keine Fluoreszenz. (Siehe Schema, Abb. 10 c) Vergr. 100 x.

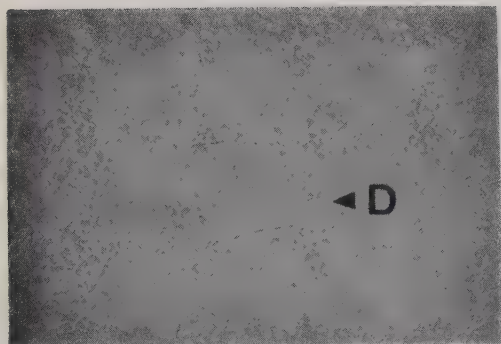


Abb. 17. Juvenilegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmes (D) nach Blockierung der Antigene mit unmarkierten Gammaglobulinen experimentell infizierter Kaninchen und anschließender Behandlung mit FITC-markierten Gammaglobulinen: Keine Fluoreszenz. (Siehe Schema Abb. 10 b) Vergr. 100 x.

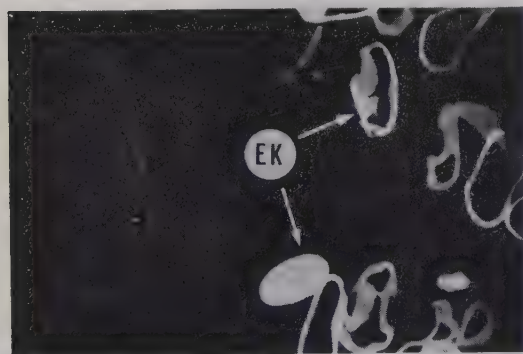


Abb. 18. Adultegel-Flächenschnitt: Eigenfluoreszenz der Eikapseln (EK) im Uterusbereich. Vergr. 100 x.

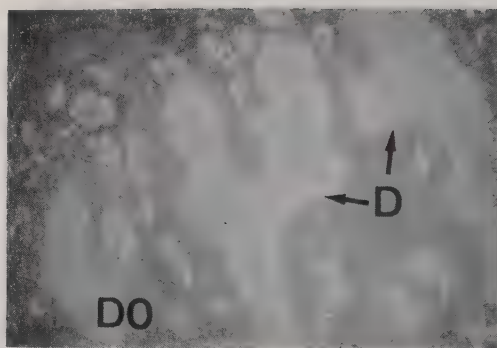


Abb. 19. Adultegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmes (D) nach Behandlung mit FITC - markierten Gammaglobulinen experimentell infizierter Kaninchen: Intensive spezifische Fluoreszenz. DO = Eigenfluoreszenz im Bereich des Dotterstocks. Vergr. 100 x.

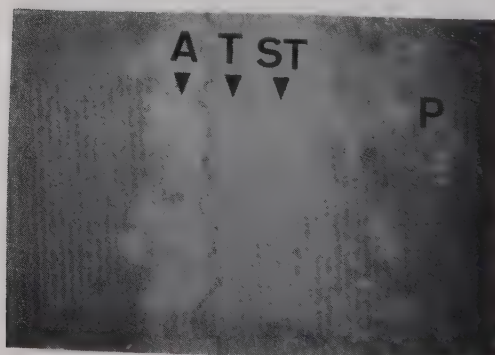


Abb. 20. Adultegel-Querschnitt: Spezifische Fluoreszenz des Teguments (T) und des Subtegumentbereiches (ST). A = Abgeschiedenes Antigenmaterial; P = Parenchym. Vergr. 100 x.

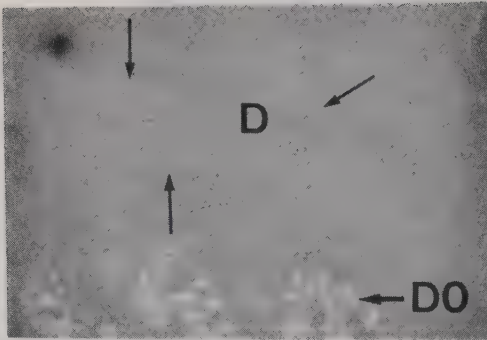


Abb. 21. Adultegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmes (D) nach Behandlung mit neutralisierten FITC - markierten Gammaglobulin experimentell infizierter Kaninchen: Keine Fluoreszenz. DO = Dotterstockbereich mit Eigenfluoreszenz. (Siehe Schema Abb. 10 d). Vergr. 100 x.

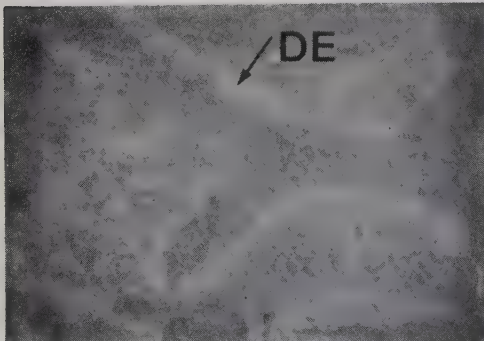


Abb. 22. Juvenilegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmepithels (DE) nach Behandlung mit FITC - markierten Anti-f1/f5 Gammaglobulin (Kaninchen): Spezifische schwache Fluoreszenz. Vergr. 100 x.



Abb. 23. Adultegel-Flächenschnitt: Reaktionsbild des Darmepithels (DE) nach Behandlung mit FITC - markierten Anti-f1/f5 Gammaglobulin (Kaninchen): Spezifische schwache Fluoreszenz. Vergr. 100 x.

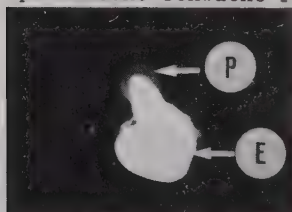


Abb. 24. Lebender Jungegel (E) im Agarose/Serum-Gemisch (Serum: Experimentelle Fasciolose/Kaninchen) P = Präzipitathof im Bereich des Mundsaugnapfes. Vergr. 8 x.

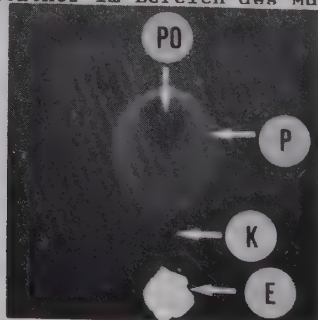


Abb. 25. Lebender Jungegel (E) im Agarose/Serum-Gemisch (Serum: Experimentelle Fasciolose/Kaninchen). P = Präzipitathof im Einbettungsbereich; PO = Ehemalige Position des abgewanderten Egels; K = Kriechspur des Egels mit Präzipitat. Vergr. 5 x.

IV. D i s k u s s i o n

Die im Verlauf einer Fasciolose registrierte Bildung humoraler Antikörper wird durch funktionelle Leberegel-Antigene stimuliert. Grundsätzlich könnte die Antigenausscheidung in vivo auf dem Wege über die gesamte Körperoberfläche erfolgen, zum anderen über die Mundöffnung, die bei den digenen Trematoden die Funktion des Afters übernimmt und durch die in Form des sogenannten Regurgitats Verdauungsrückstände permanent abgegeben werden. Denkbar ist auch ein Antigenausscheidungsmodus über die Exkretionsblase und, zumindest bei Adultegeln, auch über den männlichen und weiblichen Geschlechtsporus. Bei unseren Versuchen der Markierung der funktionellen Fasciola-Antigene mit FITC-gekoppelten Gamma-globulinen aus Antiseren experimentell infizierter Kaninchen an Gefrierschnitten, konnte ihre Lokalisation sowohl bei Juvenil- als auch bei Adultegeln nur im Darmepithel, dem Tegument bzw. der direkt unter dem Tegument und dem Hautmuskelschlauch liegenden Gewebsschicht (Cortikalschicht des Parenchyms) festgestellt werden.

Verglichen werden können diese Befunde mit den Ergebnissen von THORPE (1964), der bei Fasciola hepatica ähnliche Versuche mit FITC-gekoppelten Antiseren durchführte. Er berichtete über eine spezifische Antigenmarkierung im Darm und im Tegumentbereich. Außerdem stellte er noch eine Antigen-Antikörperreaktion im Uterus, der Mehlis'schen Drüse und dem Exkretionssystem fest.

Demgegenüber wurde bei unseren Versuchen in den letztgenannten Bereichen keine spezifische Fluoreszenz registriert.

Um die FITC-Markierungsbefunde zu überprüfen bzw. zu ergänzen, kontrollierten wir die Antigenausscheidungsgebiete am lebenden Egel. Dazu wurde eine Methode herangezogen, die auf der Basis einer streng auf den Ort der Antigenabgabe begrenzten Präzipitationsreaktion mit den homologen Antikörpern eine exakte Aussage erlaubt. Auch bei dieser Überprüfung ließen sich nur 1. die Körperoberfläche und 2. die Mundöffnung der Egel als Bereiche der Antigenabgabe identifizieren. Somit scheint die Aussage berechtigt, daß die gesamten funktionellen Fasciola-Antigene im Darmepithel und im Tegumentbereich lokalisiert sind.

Vergleiche mit den Resultaten von SUN und GIBSON (1969 b) die bei Kontrollen der Antigenlokalisierung mit FITC - markierten Antikörpern (indirekte Fluoreszenzmethode) bei Adultegeln von *Clonorchis sinensis* erzielt wurden, lassen eine weitgehende Übereinstimmung mit unseren Befunden erkennen: Auch hier ist die mit Antikörpern experimentell infizierter Wirte erzielte spezifische Antigenmarkierung im wesentlichen begrenzt auf das Darmepithel bzw. den Tegumentbereich. Daneben bemerkten die Autoren manchmal noch eine schwache Fluoreszenz des Hodens und Ovars.

Ob die von SUN und GIBSON bzw. von THORPE beschriebene Farbreaktion des Hodens und Ovars bzw. der Mehlis'schen Drüse, des Uterus und des Exkretionssystems adulter Egel spezifisch ist, muß

dahingestellt bleiben. Im Rahmen dieser Arbeit konnten wir jedenfalls niemals eine spezifische Fluoreszenz in diesen Bereichen bemerken. Wie eingangs erwähnt, ist es durchaus denkbar, daß Adultegel z.B. bei der Eiablage Uterussubstanzen freisetzen, die antigenen Charakter haben. Ihre Synthese könnte durchaus bereits im Ovar erfolgen, so daß ein spezifischer Fluoreszenznachweis mit den homologen Antikörpern im Bereich des Ovars verständlich würde.

Beim Versuch der Erklärung der Befunddifferenzen muß bei Experimenten mit FITC - markierten Antikörpern der Wahl der Methode bei der FITC-Kopplung große Bedeutung beigemessen werden. Dies gilt auch für die durchgeführten Kontrollexperimente, deren Auswahl ganz wesentlich ist für die Beurteilung, inwieweit eine Fluoreszenz eindeutig spezifisch ist. Wie u.a. aus dem methodischen Teil dieser Arbeit zu entnehmen ist, wurden in diesem Zusammenhang die strengsten Maßstäbe angelegt, um unspezifische Reaktionen zu vermeiden. Interpretiert man auf der Basis dieser methodischen Voraussetzung die Befunde von THORPE, so müssen einige Bedenken geltend gemacht werden. Sie beziehen sich vor allem auf die Herstellung der FITC - gekoppelten Gammaglobuline und die Auswahl der Spezifitätskontrollen. Es ist eindeutig, daß nicht nur optimal konjugiertes FITC - Gammaglobulin verwendet und daß nur ein einziger Kontrolltest zum Spezifitätsnachweis durchgeführt wurde. Diese Voraussetzungen zwingen zu einer gewissen Zurückhaltung bei der Beurteilung der von THORPE mitgeteilten Ergebnisse.

Diese Bedenken kommen bei der Beurteilung der Befunde von SUN und GIBSON nicht auf, die sich von unseren Ergebnissen nur dadurch unterscheiden, daß manchmal noch ein spezifischer Antigennachweis im Ovar bzw. in den Hoden gelang. Niemals jedoch wurde eine Fluoreszenz des Uterus bemerkt. Darin liegt unseres Erachtens insofern eine Inkonsequenz als nicht verständlich ist, wie die "Ovarantigene" vom Egel ausgeschieden werden können, es sei denn auf dem Wege über den Uterus und den weiblichen Geschlechtsporus. - Erwähnenswert ist der Hinweis dieser Autoren, daß die Enzyme ATPase und Succinat - Dehydrogenase, die von *Clonorchis sinensis* im Bereich des Mund- und Bauchsaugnapfes abgegeben werden, antigenen Charakter haben sollen und mit den homologen FITC - markierten Antikörpern nachweisbar sind. Bei unseren Versuchen mit *Fasciola hepatica* liegt ein derartiger Befund nicht eindeutig vor.

Bei den Versuchen der selektiven Markierung zweier funktioneller *Fasciola hepatica* - Antigene (f1 bzw. f5) in situ, konnte bei Juvenil- und Adultegeln ebenfalls das Darmepithel und die Tegumentzone als Bereich der Antigenlokalisierung ausgewiesen werden. Verglichen mit der intensiven Fluoreszenz bei Verwendung des Gesamtspektrums der Fasciolose - Antikörper war die Farbreaktion jedoch wesentlich schwächer.

Kurz vor Abschluß unserer Experimente teilte TAILLIEZ (1970) die Ergebnisse ähnlicher Untersuchungen bei Adultegeln von *Fasciola hepatica* mit. Er beschreibt den selektiven Nachweis von 3 funktionellen *Fasciola* - Antigenen (fIIa, fIIb, fIIc)

in situ, die wie unsere Antigene genusspezifischen Charakter haben. Zum Nachweis wurden monospezifische homologe Antiseren in der direkten Fluoreszenz-methode verwendet, sowie ein Markierungsverfahren mit radioaktivem Jod (J^{131}). Danach beschränkt sich die Lokalisation der geprüften Antigene ausschließlich auf den Tegumentbereich. Das Darm-epithel war antigenfrei. Dieser Befund weicht demnach im letzten Punkt von unseren Ergebnissen ab, wenn-gleich immunologische Vergleichsprüfungen zumindest eine Antigenverwandtschaft der von TAILLIEZ und der von uns geprüften Antigene aufdeckten. Auf Grund dieser Antigenidentität oder Teilidentität müßte eigentlich auch eine Übereinstimmung in der Lokalisation in situ bestehen. In diesem Zusammen-hang muß noch einmal auf die Befunde hingewiesen werden, die sich bei der Kontrolle der Antigen-ausscheidung am lebenden Egel ergaben. Bei Ver-wendung von Anti f1 bzw. f5 - Serum zeigten sich Präzipitatsreaktionen sowohl im Bereich der ge-samten Körperoberfläche als auch speziell im Be-reich der Mundöffnung. Somit scheint gesichert, daß die beiden genusspezifischen Fasciola - Antigene f1 und f5 tatsächlich auch im Darmepithel lokalisiert sind, wie dies bereits mit Hilfe homologer FITC - markierter Antikörper nachgewiesen wurde.

V. Zusammenfassung

1) Geschildert werden die Ergebnisse des pauschalen und selektiven Nachweises funktioneller Fasciola hepatica - Antigene in situ mit Hilfe fluoreszein-isothiocyanat (FITC) - markierter Antikörper. Angewandt wurde die direkte Fluoreszenzmethode nach COONS u. KAPLAN an Gefrierschnitten von Jungeregeln (20. - 24. Tag p.i.) aus der Lebergewebsphase und bei erwachsenen Egel aus der Gallengangsphase.

2) Ergänzend dazu wurden gezielte Kontrollen des Antigenausscheidungsmodus auf der Basis von Präzipitationsreaktionen an Jungeregeln in vivo vorgenommen.

3) Bei der FITC - Kopplung von Antikörpern und Normalgammaglobulinen wurden die zur Zeit als optimal anerkannten Verfahren beachtet und angewendet. Zusammen mit einer Reihe unerläßlicher, aussagekräftiger Kontrollprüfungen der Fluoreszenzspezifität war somit die Voraussetzung für gesicherte Befunde gegeben.

4) Besonderer Wert gelegt wurde auf stete Kontrollen der in vitro - Reaktionsqualität der als Indikatoren eingesetzten FITC - Antikörper - Konjugate.

5) Für den Pauschalnachweis der Lokalisation der funktionellen Fasciola - Antigene in situ wurden FITC - markierte Gammaglobuline experimentell infizierter Kaninchen verwendet.

6) Für den selektiven Nachweis standen die homologen FITC - markierten Antikörper von 2 genusspezifischen Fasciola - Antigenen zur Verfügung.

Sie wurden über den Weg der Antigenisolierung und anschließender Sensibilisierung von Kaninchen bzw. durch gezielte Neutralisation von Fasciolose - Antiserum hergestellt.

7) Die Gesamtheit der funktionellen Fasciola - Antigene ist sowohl bei Jung- als auch bei Adultegeln im Darmepithel und Tegumentbereich einschließlich der unterhalb des Hautmuskelschlauches gelegenen Cortikalschicht des Leberegelparenchyms lokalisiert.

8) Die Ausscheidung aller Antigene erfolgt in vivo über die gesamte Körperoberfläche und innerhalb des Regurgitats durch die Mundöffnung der Egel.

9) Die Prüfung der Lokalisation zweier genusspezifischer Fasciola - Antigene (f1 bzw. f5) in situ weist ebenfalls das Darmepithel und das Tegument einschließlich der Cortikalschicht des Leberegelparenchyms als Antigenbereiche aus. Dieser Befund gilt sowohl für Jung- als auch für Adultegel.

10) Die Ausscheidung dieser beiden Antigene erfolgt in vivo ebenfalls über die gesamte Körperoberfläche und innerhalb des Regurgitats durch die Mundöffnung der Egel.

VI. L i t e r a t u r

ANDRADE, Z.A., PARONETTO, F. and POPPER, H.:
Immunocytochemical studies on schistosomiasis.
Am. J. Pathol., 39, 589-598 (1961).

COONS, A.H and KAPLAN, M.H.: Localization of
antigen in tissue cells, II. Improvements in a
method for the detection of antigen by means of
fluorescent antibody. J. Exptl. Med., 91, 1-13
(1950).

GEYER, E.: Isolierung und Charakterisierung eines
Fasciola hepatica-Antigens. Z. Parasitenk. 31,
3-5 (1968).

—— : Immunology and serology of fascioliasis.
Proc. 2nd Int. Liver-Fluke Coll. Wageningen (1968).

—— : Darstellung und Charakterisierung eines
Fasciola hepatica-Totalhomogenatextrakt-Antigens.
Z. Parasitenk. 32, 135-163 (1969).

—— und ASCHOFF, H.J.: Darstellung und Charakteri-
sierung "funktioneller" Fasciola hepatica-Antigene.
J. Parasit. 4, 114 (1970).

KORACHI, S.: Isolement et propriétés d'une lipoprotéine
soluble de Fasciola hepatica. Biochim. biophys. Acta
(Amst.) 125, 335-351 (1966).

———, BÉLIERT, J. et SARDER, G.: Isolement d'un antigène lipoidique complet de *Fasciola hepatica*. C.R. Acad. Sci. (Paris) 235, 570-572 (1961).

———, et BÉLEX, J.: A lipoprotein antigen in *Fasciola hepatica*. I. Isolation, physical and chemical data. Exp. Paras. 19, 193-198 (1966 a).

——— : A lipoprotein in *Fasciola hepatica*. II. Immunological and immunochemical properties. Exp. Parasit. 19, 199-205 (1966 b).

LICHTENBERG, R. v.: Studies on granuloma formation. III. Antigen sequestration and destruction in the schistosome pseudotubercle. Am. J. Pathol., 45, 75-87 (1964).

MAEKAWA, K.: Studies on allergen of *Fasciola hepatica*. III. Separation of allergenic substances (C5 and P4). Agric. biol. Chem. Tokyo 25, 542-549 (1961 a).

——— : Studies on allergen of *Fasciola hepatica*. IV. Composition of allergen P4. Agric. biol. Chem. Tokyo 25, 550-552 (1961 b).

——— : Studies on allergen of *Fasciola hepatica*. V. Constitution of allergen P4. Agric. biol. Chem. Tokyo 28, 382-387 (1964).

———, KITAZAWA, K. and KUSHIBE, M.: Purification et cristallisation de l'antigène pour la dermo-réaction allergique vis-à-vis de *Fasciola hepatica*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 148, 763-765 (1954).

——— and RUBINER, M.: Sur la composition chimique de l'antigène pour dermo-réaction allergique vis-à-vis de *Fasciola hepatica*. C.R. Soc. Biol. (Paris) 150, 832-834 (1956).

MAYERSBACH, H. v. und SCHUBERT, G.: Immunhistologische Methoden. III. Die unspezifischen Reaktionen zwischen markierten Seren und Geweben bei der immunhistologischen Technik. Acta histochem. 10, 44-82 (1960).

SADUN, E.H.: Seminar on immunity to parasitic helminths. VII. Fluoreszent antibody technique for helminth infections. Exptl. Parasitol., 13, 72-82 (1963).

———, ANDERSON, R.I. and WILLIAMS, J.S.: The nature of fluorescent antibody reactions in infections and artificial immunizations with *Schistosoma mansoni*. Bull. WHO, 27, 151-159 (1962 b).

SAINT-MARIE, G.: A paraffin embedding technique für studies employing immunofluorescence. J. Histochem. Cytochem. 10, 250-256 (1962).

SATO, S., IMAMURA, S. and YONEYAMA, K.: Fluoreszent antibody studies of *Schistosoma japonicum* infections. Gunma J. Med. Sci. 13, 199-205 (1964).

SUN, T.: The in vitro action of antisera on the adults of *Clonorchis sinensis*. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., In press. (1969 b).

—— and GIBSON, J.B.: The sites of antigen formation in different developmental stages of *Clonorchis sinensis*. Jap. J. med. Sci. Biol. 22, 263-271 (1969).

TAILLIEZ, R.: Isolement et etude d'un antigène spécifique de la grande douve du foie (*Fasciola hepatica* L.). Biologie Med., 69, 183-287 (1970).

——, MANGALO, R. et KORACH, S.: Isolement d'un antigène spécifique de la grande douve du foie (*Fasciola hepatica* L.). C.R. Acad. Sci. (Paris) 265, 466-469 (1967).

—— et KORACH, S.: Les antigènes de *Fasciola hepatica*. Isolement et caracterisation d'un antigène spécifique du genre. Annls Inst. Pasteur, Paris, 118, 61-78 (1970).

THORPE, E.: An immunocytochemical study with *Fasciola hepatica*. Parasitology 55, 209-214 (1965).

VOSS, H., HENNEBERG, R., HERRMANN, R., PICHL, H., SCHULTE-OVERBERG, S. und WERNER, H.: Die Kopplung von Immunseren mit Fluoresceinisothiocyanat. Zentbl. Bakt. ParasitKde, (I. Orig.) 202, 249-276 (1967).

Meinem verehrten Lehrer, Prof.Dr. Egbert Geyer,
danke ich für die Überlassung des Themas der Arbeit
und die Förderung und Unterstützung bei den Untersuchungen.

Am 12.2.1943 wurde ich in Sechserben, Krs. Gerdauen, geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule, anschließend bis 1961 die Mittelschule. 1965 legte ich am Gymnasium des Landschulheims Steinmühle in Cappel/Marburg die Reifeprüfung ab.

Vom SS 1965 bis zum SS 1970 studierte ich in Marburg Biologie und bestand 1971 die Diplomhauptprüfung.

Vom WS 1970/71 studierte ich in Marburg Medizin und legte im WS 1974 das Staatsexamen ab.

Meine akademischen Lehrer waren:

Amon, Ch. Buchholtz, R. Buchholz, v. Denffer, Dimroth,
Dölle, Exner, Friederich, Ganz, Geyer, Hamelmann, Hensel,
Henßen, Heuser, Hort, Kamke, Klaus, Koecke, Linneweh, Lüdtk.
Martini, Nultsch, Pfeil, Petry, Rohen, Reim, Rodeck,
Schleyer, Schmitz-Moormann, Schwantes, Seidel, v. Stosch,
Walcher.

